



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**Optimización de parámetros de fermentación de
Aspergillus niger para la producción de glucoamilasas
con aplicación en la clarificación de jugo de manzana.**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Ingeniero Químico

Autor:

Claudia Vanessa Gallardo Aguilar
C.I. 0704919281

Director:

Dra. María Elena Cazar Ramírez, Ph.D
C.I. 0602243800

Cuenca-Ecuador

2017

RESUMEN

En el presente trabajo se optimizó un medio de cultivo para fermentación en estado sólido del hongo filamentoso *Aspergillus niger*. El objetivo planteado fue establecer las condiciones que maximicen la producción de enzimas glucoamilasas, resultado del metabolismo secundario del hongo en estudio.

Aspergillus niger fue aislado a partir de muestras de suelo dilución seriada. La cepa del hongo fue inoculada a un medio de cultivo formulado a partir de arroz, enriquecido con diferentes proporciones de glucosa como fuente de carbono y levadura como fuente de nitrógeno. Estos factores, unidos al tiempo de fermentación, permitieron establecer un diseño experimental 2³. Transcurrió el tiempo establecido en las condiciones experimentales, se obtuvo un aislado de enzimas hidrolíticas mediante extracción acuosa.

Los aislados enzimáticos fueron evaluados por su capacidad de hidrolizar un sustrato de almidón en glucosa. La cantidad de glucosa liberada fue cuantificada mediante Espectrofotometría Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR). Los espectros de los hidrolizados fueron registrados en modo absorbancia, siendo esta variable aplicada a una curva de calibración realizada con soluciones estándar de glucosa. Los hidrolizados que presentaron mejor actividad enzimática se generaron en procesos de fermentación en estado sólido con 0.1 g de glucosa, 0,1 g de levadura y 168 horas de fermentación.

Para evaluar el potencial de aislados enzimáticos de mejor actividad hidrolítica, se valoró el potencial de clarificar jugo de manzana artesanal. Se estudiaron los cambios en el porcentaje de transmitancia del jugo sin tratamiento versus el jugo luego de un proceso hidrolítico con los aislados enzimáticos. Los aislados enzimáticos más activos, seleccionados mediante diseño experimental, generaron jugos con una transmitancia de 31,20%. El porcentaje de transmitancia del jugo sin tratamiento fue de 0,32%. Los resultados demuestran que la producción de aislados enzimáticos fruto del metabolismo fungal es posible en condiciones de fermentación en estado sólido y tiene potencial aplicación en clarificación de jugos.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, actividad enzimática, clarificación enzimática, fermentación en estado sólido.

ABSTRACT

In the present work, a cultivation medium was optimized for fermentation in the solid state of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The set objective was to establish the conditions that maximize the production of glucoamylase enzymes, that is a result of the secondary metabolism of the fungus under study.

Aspergillus niger was isolated from soil samples serial dilution. The strain of the fungus was inoculated into a culture medium formulated from rice and enriched with different proportions of glucose as a carbon source and yeast as a nitrogen source. These factors, joined to the fermentation time, allowed to establish an experimental design 2^3 . After the established time in the experimental conditions, an isolate of hydrolytic enzymes was obtained by aqueous extraction

The enzymatic isolates were evaluated for their ability to hydrolyze a starch substrate into glucose. The amount of glucose released was quantified by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIS). The spectra of the hydrolysates were recorded in absorbance mode, this variable was applied to a calibration curve made with standard glucose solutions. The hydrolysates that showed the best enzymatic activity were generated in fermentation processes in solid state with 0.1 g of glucose, 0.1 g of yeast and 168 hours of fermentation.

To evaluate the potential of enzymatic isolates with better hydrolytic activity, the potential to clarify artisanal apple juice was assessed. Changes in the percentage of transmittance of the juice without treatment versus the juice after a hydrolytic process with the enzymatic isolates were studied. The most active enzymatic isolates, selected by experimental design, generated juices with a transmittance of 31.20%. The percentage of transmittance of the juice without treatment was 0.32%. The results show that the production of enzymatic isolates, fruit of fungal metabolism, is possible under fermentation conditions in solid state and has potential application in clarification of juices.

Key words: *Aspergillus niger*, enzymatic activity, enzymatic clarification, fermentation in solid state.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
CLÁUSULAS DE RESPONSABILIDAD.....	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA.....	9
AGRADECIMIENTOS	10
INTRODUCCIÓN.....	11
1 CONTENIDO TEÓRICO	13
1.1 Microbiología industrial.....	13
1.1.1 Levaduras.....	13
1.1.2 Bacterias.....	13
1.1.3 Hongos filamentosos	14
1.2 Obtención y producción de enzimas	14
1.3 Enzimas generadas a partir del metabolismo microbiano.....	15
1.3.1 Generalidades	15
1.3.2 Clasificación de las enzimas.....	15
1.4 Enzimas hidrolíticas de polisacáridos: Glucoamilasas	18
1.5 Métodos de producción de enzimas microbianas	18
1.5.1 Fermentación en estado sólido	18
1.6 Aplicaciones de enzimas industriales	20
1.7 Cuantificación de actividad enzimática por espectroscopía FTIR.....	21
1.7.1 Espectrofotometría Infrarroja, IR	21
1.7.2 Espectrofotometría UV-VIS.....	22
1.8 Diseño experimental.....	23
2 METODOLOGÍA	24
2.1 Área de estudio.....	24
2.2 Medios de cultivo	24
2.3 Aislamiento de hongo filamentoso, <i>Aspergillus niger</i>	24
2.4 Optimización de los parámetros para fermentación en estado sólido de <i>Aspergillus niger</i>	25
2.5 Preparación de sustratos para la fermentación en estado sólido de <i>A. niger</i> . 26	



2.6	Extracción del concentrado enzimático.....	27
2.7	Cuantificación de actividad enzimática.....	27
2.8	Clarificación enzimática en jugo de manzana	28
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1	Optimización de parámetros de fermentación en estado sólido de <i>Aspergillus niger</i>	29
3.2	Clarificación enzimática de jugo de manzana	32
4	CONCLUSIONES	34
5	RECOMENDACIONES	35
6	BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS	36
7	ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Microorganismos productores de enzimas.</i>	15
<i>Cuadro 2. Clasificación de las enzimas.</i>	16
<i>Cuadro 3. Clasificación de las enzimas Esterasas.</i>	16
<i>Cuadro 4. Clasificación de las enzimas Carbohidrasas.</i>	17
<i>Cuadro 5. Clasificación de las enzimas Proteasas.</i>	17
<i>Cuadro 6. Clasificación de las enzimas Oxidasas.</i>	17
<i>Cuadro 7. Región del espectro infrarrojo.</i>	22
<i>Cuadro 8. Límites de los factores que se variarían en el proyecto de investigación.</i>	26
<i>Cuadro 9. Matriz de diseño experimental 2³.</i>	26
<i>Cuadro 10. Componentes del sustrato para la fermentación de estado sólido.</i>	26
<i>Cuadro 11. Datos de concentración y absorbancia para curva de glucosa.</i>	29
<i>Cuadro 12. Diseño experimental para FES y actividad enzimática expresada como porcentaje de glucosa. (*Promedio de tres repeticiones)</i>	30
<i>Cuadro 13. Resultados de los parámetros de fermentación. Concentración de glucosa (X₁), concentración de levadura (X₂) y tiempo de fermentación (x₃).</i>	31
<i>Cuadro 14. Valores de transmitancia a una longitud de onda de 650 nm.</i>	32

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Ilustración de los componentes de un espectrofotómetro infrarrojo por transformadas de Fourier.</i>	39
<i>Anexo 3. Ilustración de los componentes básicos de un espectrofotómetro UV-VIS.</i>	40
<i>Anexo 4. Tabla de los valores obtenidos en las condiciones experimentales por triplicado.</i>	40
<i>Anexo 5. Fotografías de Trabajo de Investigación.</i>	41

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Claudia Vanessa Gallardo Aguilar en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Optimización de parámetros de fermentación de *Aspergillus niger* para la producción de glucoamilasas con aplicación en la clarificación de jugo de manzana”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 08 de enero del 2018



Claudia Vanessa Gallardo Aguilar

C.I: 0704919281

Cláusula de Propiedad Intelectual

Claudia Vanessa Gallardo Aguilar, autora del trabajo de titulación “Optimización de parámetros de fermentación de *Aspergillus niger* para la producción de glucoamilasas con aplicación en la clarificación de jugo de manzana”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de enero del 2018



Claudia Vanessa Gallardo Aguilar

C.I: 0704919281



DEDICATORIA

Dedico este logro a mi madre, Marina, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, a mis hermanos José Luis y Rafael y a mi hermana Michelle por su cariño, consejos y compañía.

Vanessa



AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a las autoridades y personal de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, por toda su disposición y buena voluntad y así facilitar mí trabajo en la presente investigación.

De manera especial a la Dra. María Elena Cazar por su tiempo y disponibilidad para guiarme en cada momento, compartiendo su conocimiento y experiencia profesional.

A mi familia y amigos por brindarme todo su apoyo y confianza, permitiendo la culminación de este proyecto.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha observado un incremento considerable en la aplicación de la fermentación en estado sólido para la obtención de moléculas útiles en la industria e investigación. Se trata de una alternativa viable para obtener principios activos como enzimas, metabolitos primarios y secundarios (Negi y Banerjee, 2009; Pandey, 2002).

La fermentación en estado sólido (FES) se define como un proceso de fermentación que involucra matrices sólidas, y se lleva a cabo con muy baja presencia de agua libre. No obstante, el sustrato debe poseer suficiente humedad para dar lugar al crecimiento y metabolismo del microorganismo. La matriz sólida puede ser la fuente de nutrientes o un soporte impregnado con nutrientes adecuados (Singhania y *col.*, 2009).

Este método fomenta el desarrollo ecológicamente sostenible, dado que permite la utilización de sustratos asequibles e incluso desechos de algunas industrias, como industria alimenticia, bebidas y agro como soporte sólido (Puri y *col.*, 2013). Asimismo se pueden generar nuevos procesos para el aprovechamiento integral de biomasa, pudiendo llevarlos a gran escala como las biorrefinerías, ya que estas ofrecen una respuesta sustentable integrando diferentes procesos y tecnologías de conversión de biomasa, para producir una amplia variedad de bioproductos (Ochoa, 2007).

La producción de enzimas a nivel industrial a partir de microorganismos ha llamado mucho la atención, dada su aplicabilidad en varios procesos químicos. Para la producción de enzimas a nivel industrial se utiliza en gran medida los hongos filamentosos (Holker y *col.*, 2003; Ellaiah y *col.*, 2002). Existen muchas reacciones químicas que pueden realizarse por rutas enzimáticas, sobre todo en la industria de alimentos. Las enzimas son específicas en su forma de actuar, no conllevan a la realización de reacciones secundarias, actúan en bajas concentraciones, además que se pueden inactivar fácilmente después de ser utilizadas (Parbat y Singhal, 2011; Bagheri y *col.*, 2014).

Los microorganismos también pueden ser utilizados en biotransformaciones microbianas, ya que estos consiguen modificar químicamente una gran variedad de compuestos orgánicos, pueden ser muy específicas dependiendo del compuesto orgánico de interés. Con este tipo de proceso se pueden obtener con una síntesis rápida, y una reacción suave compuestos más puros, siendo los subproductos



biodegradables o reutilizables. Este tipo de biotransformaciones se ha ido utilizando en la industria farmacéutica, de alimentos, plásticos, perfumería y automotriz (Correa y col., 2009).

El presente trabajo tiene como objetivo optimizar los parámetros de fermentación de un medio de cultivo sólido para la obtención de enzimas glucoamilasas a partir del hongo imperfecto *Aspergillus niger*. Mediante estrategias de diseño experimental, se exploraron las condiciones de crecimiento que generan la mayor actividad enzimática a escala de laboratorio. Además, los concentrados enzimáticos que presentaron la mayor actividad hidrolítica fueron probados como agentes clarificadores de jugo de manzana.

Los resultados obtenidos son promisorios y señalan a la fermentación en estado sólido como una estrategia viable en la producción de enzimas hidrolíticas, con una prometedora aplicación en la industria de alimentos.

1 CONTENIDO TEÓRICO

1.1 Microbiología industrial

Es la parte de la microbiología que se encarga de las aplicaciones industriales que tienen los microorganismos. Los que más se utilizan son levaduras, hongos filamentosos y bacterias filamentosas, ya que estas son más fáciles de separar del medio de cultivo, se sedimentan más rápido e incluso son más fáciles de filtrar. Esta clase de microorganismos son muy apreciados ya que elaboran sustancias que no se producen de manera fácil o más barata (Morales, 2012). Son utilizados para la modificación de las propiedades de alimentos, la producción de bebidas alcohólicas y la participación en transformaciones químicas (Lagarda, 2006).

1.1.1 Levaduras

Son organismos unicelulares, generalmente ovoides, esféricos y elipsoidales, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se pueden reproducir de forma asexual por gemación y sexualmente por la formación de ascosporas. Las levaduras pueden crecer de forma anaerobia como aerobia, por lo tanto son facultativas (Tortora y col., 2007). Son los microorganismos más importantes en la industria, ya que se vienen utilizando hace miles de años, muchas de estas especies pueden convertir los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono y para sintetizar ciertas vitaminas, grasas y proteínas. Una de las levaduras más importante es la *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es utilizada en la producción de bebidas alcohólicas y panificación (Hernández y col., 2003).

1.1.2 Bacterias

Son procariotas, es decir, no tienen núcleo, ni orgánulos internos, pueden ser esferas, alargadas o en espiral, presentan una reproducción asexual, normalmente por fisión binaria o bipartición. Son muy utilizadas en la industria, unas de las que se tiene gran interés son las del ácido acético, *Gluconobacter* y *Acetobacter*, convierten el etanol en ácido acético, otras bacterias del género *Clostridium* pueden fermentar los azúcares generando acetona y butanol, también se encuentran las del género *Bacillus*, productoras de antibióticos (gramicidina, bacitracina, polimixina), como también lo son las *Streptomyces* (anfotericina B, Kanamicina, neomicina) (Tortora y col., 2007).

1.1.3 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos crecen con una estructura similar a hilos, llamadas hifas, las cuales al unirse forman una masa llamada micelo. Se reproducen por medio de esporas, pueden ser asexuales y sexuales, son aerobios y saprófilos, es decir, se alimentan de materia orgánica en descomposición. En la industria son utilizados principalmente para la producción de ácidos orgánicos (cítrico, láctico, glucónico) los hongos de las especies *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, enzimas comerciales (amilasas, glucoamilasas, proteasas, pectinasas), hongos *Aspergillus* y *Rhizopus*, quesos especiales (camembert, roquefort) los hongos *Penicillium* (Morales, 2012; Glynn y Gary, 1999).

Dentro de este grupo de microorganismos la especie más significativa para este estudio es *Aspergillus niger*, ya que interviene en la producción de enzimas glucoamilasas.

1.2 Obtención y producción de enzimas

Las enzimas pueden ser de origen animal, vegetal y microbiano. La elección de la fuente será de acuerdo al tipo de enzima que se quiera obtener, como su estabilidad, especificidad, costo y abundancia de la misma, ya que hay una gran variedad de microorganismos con disponibilidad continua. Las enzimas microbianas se pueden producir a gran escala, una enzima producida por medio de microorganismos es conocida como GRAS (Generalmente reconocido como seguro). En la industria se utiliza solo el 8% de enzimas de origen animal y el 4% de origen vegetal, mientras que la mayoría son de origen microbiano (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) (Rodríguez, 2005).

Lo más importante es la elección del microorganismo para el proceso y el sustrato, que sea capaz de sintetizar la enzima deseada (Rodríguez, 2005). Los microorganismos deben de poder crecer rápidamente a grado industrial a un costo razonable, no deben de ser patógenos, no deben de estar asociados a la producción de toxinas, deben de tener una gran tolerancia a pH extremos, resistencia a la inhibición por iones. Además se los puede escoger de acuerdo a las características que se desean en la enzima que se quiere producir (García y col., 2004).

Microorganismos	Enzima
<i>Aspergillus niger</i>	α -amilasa, celulasa, glucoamilasa, lactasa, pectinasa, catalasa, glucosa oxidasa, proteasa, lipasa
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -amilasa, glucoamilasa, lactasa, lipasa
<i>Rhizopus oryzae</i>	α -amilasa, glucoamilasa, pectinasa
<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilasa, proteasa
<i>Bacillus licheniformis</i>	α -amilasa,
<i>Rhizopus niveus</i>	Glucoamilasa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactasa
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactasa
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Glucosa isomerasa
<i>Actinoplanis missouriensis</i>	Glucosa isomerasa
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Glucosa isomerasa
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Glucosa isomerasa
<i>Bacillus coagulans</i>	Glucosa isomerasa
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Glucosa isomerasa
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Catalasa
<i>Bacillus cereus</i>	Renina
<i>Endothia parasítica</i>	Renina
<i>Mucor mihei</i>	Renina, lipasa-esterasa
<i>Mucor pusillus</i>	Renina

Cuadro 1. Microorganismos productores de enzimas.

Fuente: Rodríguez, 2005

Elaboración: Autora

1.3 Enzimas generadas a partir del metabolismo microbiano

1.3.1 Generalidades

Las enzimas son proteínas, constituidas por largas cadenas de aminoácidos con enlaces peptídicos, que actúan como biocatalizadores (Kumar, 2015). Su estructura es terciaria o cuaternaria, son capaces de incrementar la velocidad de las reacciones químicas sin modificar la estructura de los reactantes, a diferencia de los catalizadores artificiales. Las enzimas actúan en condiciones moderadas de pH y temperatura, son altamente específicas, ya que actúan sobre un determinado tipo de reacción o un determinado tipo de sustrato, no modifican el sentido de la reacción y tienen un gran poder catalítico, permitiendo flexibilidad en las condiciones de uso. Su aplicación como biocatalizadores permite que sean compatibles con tecnologías sustentables y procesos ambientalmente más limpios (Ubalde y col., 2002; Alegría y Rosales, 2014).

1.3.2 Clasificación de las enzimas

Las enzimas se pueden clasificar de acuerdo al tipo de reacción que catalizan, de esta manera se clasifican en hidrolasas y desmolasas. Para especificar su mecanismo de

acción las hidrolasas y desmolases se subdividen en grupos según su función específica.

Enzimas	Función Específica	Clase
Hidrolasas	Esterasas	Lipasas
		Fosfatasas
		Clorofilasas
	Carbohidrasas	Hexosidasas
		Poliasas
		Proteinasas
Desmolases	Proteasas	Peptidasas
		Catepsinas
	Oxidasas	Renina
		Oxidasas férricas
	Deshidrogenasas	

Cuadro 2. Clasificación de las enzimas.

Fuente: Herrera, 2015

Elaboración: Autora

1.3.2.1 Enzimas hidrolasas

También se las conoce como enzimas hidrolíticas. Participan en las reacciones de hidrólisis descomponiendo las moléculas hasta sus principios inmediatos, este tipo de reacciones se realizan en los procesos digestivos. Entre las enzimas hidrolasas más importantes se encuentran: esterasas, carbohidrasas y proteasas (Jaramillo, 2004).

Esterasas

Se encargan de hidrolizar los ésteres, transformando las grasas, aceites y otros compuestos de bajo valor en otros de mayor valor añadido. Se utilizan en la industria láctica, la elaboración de vinos, jugos de frutas, cervezas y otras bebidas alcohólicas. Las principales son: lipasas, fosfatasas y clorofilasas.

Lipasas	Desdoblan las grasas en glicerina y ácidos grasos.
Fosfatasas	Separan el ácido fosfórico de los fosfátidos de muchos compuestos orgánicos.
Clorofilasas	Separan los ácidos nucleicos por lo que también se los llama nucleotidasas, se utilizan en la industria de conservas para retener el color verde de la clorofila.

Cuadro 3. Clasificación de las enzimas Esterasas.

Fuente: Herrera, 2015

Elaboración: Autora

Carbohidrasas

También son conocidas como carboxilasas. Son capaces de hidrolizar los carbohidratos, trabajando directamente sobre los azúcares, por lo que son ampliamente

utilizados en la industria azucarera y de jugos de fruta. Se clasifican en hexosidasas y poliasas.

Hexosidasas	Se encargan en desdoblar las moléculas de los monosacáridos, entre las principales de esta clase esta la invertasa, maltasa, sacarasa y lactasa.
Poliasas	Descomponen los polisacáridos, reduciéndolos a disacáridos, las principales son la amilasa y glucoamilasa.

Cuadro 4. Clasificación de las enzimas Carbohidrasas.

Fuente: Herrera, 2015

Elaboración: Autora

Proteasas

Estas enzimas actúan rompiendo enlaces peptídicos, atacando la estructura proteica. Se clasifican en proteinasas, peptidasas, catepsina y renina.

Proteinassas	Actúan sobre las proteínas convirtiéndolas en péptidos, se utiliza en panificación.
Peptidasas	Se encargan de desdoblar los péptidos en aminoácidos.
Catepsinas	Ataca directamente las estructuras proteicas de las carnes, la utilizan como ablandadora de carne.
Renina	Ataca las proteínas de la leche, coagula la caseína.

Cuadro 5. Clasificación de las enzimas Proteasas.

Fuente: Herrera, 2015

Elaboración: Autora

1.3.2.2 Enzimas desmolassas

Las desmolassas son conocidas como enzimas respiratorias, participan en reacciones de oxidación, estas catalizan las reacciones en las que produce la desintegración de los componentes elementales de los principios inmediatos liberándose de una gran cantidad de energía. Se clasifican en: oxidasas y deshidrogenasas (Herrera, 2015).

Oxidasas

Estas enzimas se encargan de proteger a los productos deshidratados con alto contenido en grasa y otros componentes sensibles a la oxidación, además que impiden el crecimiento de microorganismos bacterianos.

Oxidasas férricas	Elimina el oxígeno causante de pérdidas de color, aroma y de vitamina C, en conservas reduce la transferencia de metales al contenido.
--------------------------	--

Cuadro 6. Clasificación de las enzimas Oxidasas.

Fuente: Herrera, 2015

Elaboración: Autora

Deshidrogenasas

Estas enzimas se encargan de separar del sustrato átomos de hidrógeno ionizándolos, separando la oxidación del sustrato, su principal aplicación es en la industria de alimentos.

1.4 Enzimas hidrolíticas de polisacáridos: Glucoamilasas

También conocidas como amiloglucosidasas o α -1,4 glucohidrolasas, son enzimas hidrolíticas, las cuales participan en reacciones de hidrólisis de carbohidratos. Son enzimas de acción extracelular, de origen microbiano, producidas por los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Schwanniomyces*, y de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter* (Sánchez y col., 2005).

Esta enzima es una glucoproteína que hidroliza fácilmente enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 y también algunos 1,3 de α -glucanos, generan como producto final glucosa y pequeñas cantidades de oligosacáridos a partir de los enlaces terminales no reductores de la cadena de almidón. No son capaces de hidrolizar completamente al almidón ya que necesitan la participación de una enzima de acción interna. Las glucoamilasas tienen un pH óptimo en 4,3 - 4,5, temperatura óptima cerca de 50 °C - 60 °C, además son estables por períodos prolongados (Arellano y Olmos, 1999; Sauer y col., 2000).

Las glucoamilasas se las puede utilizar en la industria de alimentos, industria textil, papel, producción de dextrosa, confitería y productos farmacéuticos (Anto y col., 2005).

1.5 Métodos de producción de enzimas microbianas

La producción de enzimas se puede realizar por medio de la fermentación, este proceso se lleva a cabo en un recipiente, fermentador o biorreactor, utilizando determinados sustratos que componen un medio de cultivo, son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa, este tipo de fermentación puede ser en estado sólido o sumergido, siendo la primera más eficiente.

1.5.1 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) se define como un proceso fermentativo desarrollado para la producción de enzimas, metabolitos y esporas. Para este proceso se utiliza un sustrato inerte como soporte sólido (residuos agrícolas), el cual debe tener humedad suficiente para apoyar el crecimiento y el metabolismo del microorganismo, empleando una fuente de nitrógeno y nutrientes, bajo control de las variables de

procesamiento: pH, temperatura, humedad y aireación (Pandey y *col.*, 2000; Singhanía y *col.*, 2009). Los cultivos en fermentación en estado sólido son más cercanos al hábitat natural de los microorganismos, por lo que aumentan su actividad.

La FES tiene ciertas ventajas, es un proceso que puede realizarse a partir de medios de cultivo relativamente simples, ya que generalmente un único sustrato puede proporcionar casi todos los nutrientes necesarios. Se pueden utilizar sustratos abundantes, baratos y bajos requerimientos energéticos (Singhanía y *col.*, 2009). Entre las desventajas se puede señalar que en algunas ocasiones los sustratos necesitan un pretratamiento (molienda, hidrólisis), es difícil controlar las variables de procesamiento como temperatura, pH, oxígeno libre y humedad, la frecuente necesidad de utilizar un inóculo voluminoso, además que no hay métodos simples para la cuantificación del crecimiento microbiano (Pastrana, 1996).

1.5.1.1 Variables de fermentación

En este proceso hay variables que son determinantes y definen el éxito de la fermentación en estado sólido:

Microorganismos

Hay algunos microorganismos que tienen más requerimientos que otros, por lo que no se pueden utilizar todos, las bacterias necesitan una elevada cantidad de agua por lo que solo pueden crecer en medios líquidos (fermentación sumergida), las levaduras no son tan estrictas, pero su utilización es mínima en este tipo de fermentación, en cambio los hongos son capaces de crecer en este medio, tienen capacidad de adherencia, penetración en el sustrato y facultad de utilizar mezclas de algunos polisacáridos. Además deben de poder crecer en altas concentraciones de nutrientes, tener baja tendencia a la esporulación y alta tendencia al crecimiento vegetativo (Pastrana, 1996).

Sustrato

Los sustratos deben ser insolubles en agua, tener un elevado contenido de carbohidratos y proteínas. Además de ser fermentables por un solo microorganismo, su estructura debe facilitar la adhesión y penetración del microorganismo, no tener preferencia por la aglomeración para evitar la formación de masas. Por estas razones se utiliza los granos de cereales como sustratos sólidos (Pastrana, 1996).

Temperatura

Los hongos crecen a temperatura 20-45°C, a elevadas temperaturas inhiben la germinación de esporas y la formación del producto, la temperatura óptima variará de acuerdo al microorganismo y al tiempo de fermentación (Quilantán y Manuel, 1996).

pH

Los hongos se desarrollan a un pH de 3 - 4,5, durante la fermentación el pH tiende a mantenerse estable, por lo que solo se necesita un ajuste inicial del mismo (Singhania y col., 2009).

Aireación y agitación

Este parámetro es clave para la transferencia de masa interparticular como intraparticular, aumentando la transferencia de oxígeno y la eliminación de CO₂. En fermentaciones estáticas, la aireación realiza las funciones de agitación, el aumento del flujo del aire va a mejorar el desarrollo del producto, por ende el consumo del sustrato (Quilantán y Manuel, 1996).

1.6 Aplicaciones de enzimas industriales

La biotecnología moderna tiene un gran interés en la producción y comercialización de las enzimas producidas por microorganismos, por las aplicaciones potenciales que estas tienen en la industria. Las enzimas son apropiadas para ser utilizadas si su estabilidad es suficiente para su aplicación. Se estima que alrededor del 40% de las enzimas son utilizadas en el procesamiento de alimentos y bebidas, el 30% en la industria de detergentes, el 12% en la industria textil, el 10% en la industria del papel y el resto se divide en la industria química, farmacéutica y biológica (Alegría y Rosales, 2014).

En el sector industrial se utiliza para la optimización de procesos tradicionales, reducción de costos, mejora la calidad de alimentos/productos y el desarrollo de nuevos procesos. En la industria de alimentos se utilizan como componentes en la producción, en el desarrollo de nuevos productos, en mejorar sus características organolépticas (aroma, sabor, olor y color), y aumentar su rendimiento. No son consideradas como aditivos, ya que permanecen en el producto final sin tener una función (Kumar, 2015).

En la Industria de jugos se utiliza las enzimas, ya que el consumo de jugos naturales se ha incrementado considerablemente en los últimos años, no solo por su sabor, sino por sus propiedades nutricionales, que fomentan una dieta saludable (Ribeiro y col, 2010).

Al inicio esta industria presentó algunos problemas, dificultades para filtrar el jugo debido a que la pulpa de la fruta presenta cantidades grandes de almidón que son capaces de causar turbidez o gelatinizar el jugo, amargor, dificultad en los procedimientos productivos, logrando un bajo rendimiento en la producción (Sandri y *col.*, 2013).

A través de las investigaciones de enzimas se comenzaron a solucionar este tipo problemas, porque permiten que se extraiga más jugo por tonelada de fruta, una mejor maceración, mejor extracción, mejor clarificación del jugo, estabilización el color del jugo durante el almacenamiento, con lo que se mejora el rendimiento sin costos adicionales. (kumar, 2015; Ribeiro y *col.*, 2010).

Uno de los factores más determinantes y significativos para los consumidores es la apariencia del jugo de frutas, por lo que la clarificación enzimática se presenta como una opción eficiente que mejorará la calidad en términos de viscosidad, disminución de turbidez y filtrabilidad, obteniendo como resultado un jugo más claro con sabor y color más concentrado (Sandri y *col.*, 2011). La utilización de enzimas para la clarificación de jugos también aumenta la liberación de varios compuestos fenólicos y otros componentes nutricionales importantes del mismo, los cuales pueden contribuir a la salud de las personas debido a sus propiedades antioxidantes (Sandri y *col.*, 2013).

1.7 Cuantificación de actividad enzimática por espectroscopía FTIR

Para establecer la capacidad de los concentrados enzimáticos producidos por el metabolismo microbiano, es recomendable diseñar un ensayo que requiera una mínima cantidad de muestra, además de la sensibilidad necesaria para establecer la concentración del producto hidrolizado. En este aspecto, la Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier es una estrategia asequible, que se rige por los principios de cuantificación basados en la interacción de la materia con la radiación electromagnética en la región infrarroja.

1.7.1 Espectrofotometría Infrarroja, IR

La espectrofotometría infrarroja es un método que estudia la absorción y emisión de la energía radiante, la cual se origina por las interacciones que hay entre la radiación electromagnética y el material de estudio (Piqué y Vázquez, 2012).

Es muy importante en la determinación de la estructura molecular, permitiendo determinar grupos funcionales de una molécula orgánica o discriminar estructuras en diferentes tipos de materiales, prácticamente todos los compuestos moleculares. El

espectro infrarrojo completo de un compuesto proporcionará una huella dactilar única, la cual será fácilmente distinguible del patrón de absorción de otros compuestos, cada compuesto tendrá entonces un comportamiento particular frente a un haz de infrarrojos.

El infrarrojo trabaja en una determinada zona de radiación electromagnética, la cual está situada más allá de la parte roja de la región visible. Regiones de la espectrofotometría IR:

Región	Longitud de onda μm	Número de onda cm^{-1}
Próximo (NIR)	0,78 a 2,5	12800 a 4000
Medio (MIR)	2,5 a 50	4000 a 200
Lejano (FIR)	50 a 100	200 a 10

Cuadro 7. Región del espectro infrarrojo.

Fuente: Criollo & Cueva, 2017

Elaboración: Autora

Esta técnica requiere cantidades pequeñas de muestra y no la destruye, puede utilizarse para muestras sólidas, líquidas y gaseosas (Criollo y Cueva, 2017).

1.7.1.1 Transformadas de Fourier (FTIR)

Esta técnica es más moderna, los equipos son compactos y funcionales, permiten recolectar decenas de interferogramas de la misma sustancia y guardarlos en la memoria del ordenador. Permite medir la longitud de onda de manera clara, sin la necesidad de realizar medidas de referencia o calibrados.

El equipo consiste en una fuente, un divisor de haz, dos espejos, un láser y un detector. La luz golpea el divisor de haz produciendo dos haces de la misma intensidad, un haz golpea un espejo fijo y vuelve y el otro golpea un espejo móvil, el láser es paralelo a la luz IR pasando a través del interferómetro. El haz IR pasa a través de la muestra y alcanza el detector, que registra la intensidad total, la respuesta del detector produce un interferograma. No utiliza elementos dispersores (redes de difracción, prismas, etc), por lo que al detector le llega una cantidad de luz mayor, obteniendo una relación señal-ruido superior, siendo muy útil para medir espectros de fuentes débiles. Ver *anexo 1* (Criollo y Cueva, 2017; Rodicio, 2006).

1.7.2 Espectrofotometría UV-VIS

Se fundamenta en la absorción de radiación electromagnética de determinadas longitudes de onda por parte de los analitos en la zona ultravioleta y visible del espectro permitiendo obtener el espectro de absorción, el cual es característico del mismo, proporcionando información sobre la composición y estructura del compuesto. De esta

manera moléculas diferentes presentarán espectros de absorción diferentes (Gallego y col., 2013).

Los espectros se encuentran entre 200 y 2500 nm, la región UV se encuentra entre 190 y 380 nm, la región visible entre 380 y 750 nm y el infrarrojo cercano entre 750 y 2500 nm. La región más característica es la UV para las transiciones electrónicas de los metales de transición, mientras que en el IR cercano se producen las absorciones debidas a transiciones vibracionales. Ver *anexo 2*.

Esta técnica se la puede utilizar para realizar análisis cualitativo y cuantitativo, en especies absorbentes y no absorbentes. Se aplica para determinación de estequiometría de complejos y de su estabilidad, determinación de masas moleculares, realizar valoraciones fotométricas.

1.8 Diseño experimental

El diseño experimental es una herramienta estratégica que permite planificar el mínimo número de experimentos para evaluar una situación experimental, para lograr los efectos esperados con un bajo costo, garantizando una mayor fiabilidad en los resultados (Medina y López, 2011). Cuando los factores experimentales y las respuestas han sido definidas, los experimentos pueden ser planificados y desarrollados para obtener un máximo de información con un número mínimo de experimentos. En los diseños experimentales factoriales, las influencias de todas las variables experimentales, factores y efectos de interacción de las respuestas son investigadas (Lundsted y col., 1998)

2 METODOLOGÍA

Se desarrolló un estudio exploratorio y analítico. Se analizó el proceso de fermentación en estado sólido para obtener un medio de cultivo que permita alcanzar una mayor producción de enzima.

2.1 Área de estudio

La fase experimental de este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología, adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. En este laboratorio se realizó el aislamiento del hongo *Aspergillus niger*, la optimización de los parámetros de fermentación en estado sólido y la extracción y purificación de la enzima glucoamilasa. La cuantificación de actividad enzimática y evaluación de la clarificación de jugos se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

2.2 Medios de cultivo

Para el aislamiento del hongo filamentoso *Aspergillus niger* se utilizaron dos medios de cultivo sólidos: Agar papa – dextrosa (PDA) y Agar Sabouraud – dextrosa (SDA), de la casa comercial Difco. Los medios fueron preparados según instrucciones del fabricante y autoclavados previo a su uso a 121°C y 1.1 bar por 15 minutos.

Como sustrato sólido se utilizó arroz viejo, súper CLM especial. Estudios previos han señalado que este sustrato es apropiado para la producción de enzima glucoamilasa (Anto y col., 2005; Sauer y col., 2000). El sustrato fue enriquecido con una solución de sales minerales que contuvo 3,5 g/L CaCl_2 , 4 g/L $\text{K}_2\text{H}(\text{PO}_4)$, 0,5 g/L MgSO_4 y 0,5 g/L NaCl , disueltos en 1000 mL de agua estéril (Sanjeev y col., 2003; Kunamneni y col., 2005; Negi y Banerjee 2009; Bagheri y col., 2014) y enriquecidos con levadura y glucosa, de acuerdo a lo establecido en el diseño experimental, para posteriormente ser autoclavado a 121°C y 1.1 bar por 15 minutos.

2.3 Aislamiento de hongo filamentoso, *Aspergillus niger*

Aspergillus niger fue aislado de suelo de jardín. Para aislar colonias puras se utilizó el método de dilución seriada que se describe a continuación:

La muestra de suelo es pasada por un tamiz N° 20, de 2 mm de dimensión, con el fin de eliminar rocas, residuos leñosos, etc. Se pesaron cantidades adecuadas de suelo para preparar tres diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} p/V. Estas diluciones se prepararon en

condiciones asépticas, usando como solvente agua destilada estéril y en cámara de flujo laminar.

Las diluciones de suelo preparadas según lo descrito previamente, fueron inoculadas en placas Petri con los medios sólidos PDA y SDA. Se transfirió asépticamente 1 mL de la solución previamente homogenizada en vórtex y se distribuyó en la superficie de la placa con un asa de siembra estéril desechable. Las placas con el inóculo fueron selladas con Parafilm® e incubadas a 25 °C, por siete días en una incubadora Memmert. Durante el período de incubación las placas fueron revisadas para monitorear el crecimiento fungal.

Las colonias de *Aspergillus niger* presentan un color blanco algodonoso y abundantes puntos negros. En las placas donde se observó colonias con las características macroscópicas similares a *Aspergillus niger*, se realizaron traspasos de estas colonias a placas frescas. Para verificar el género del hongo objetivo, se realizaron observaciones al microscopio. El micelio fungal fue aislado usando cinta adhesiva transparente, la cual se fijó a un portaobjetos. La observación al microscopio con objetivo 40x permitió observar estructuras reproductivas y de crecimiento concordantes con la morfología de *Aspergillus niger*.

Las esporas de *A. niger* fueron recolectadas de placas petri con un crecimiento abundante del hongo objetivo. En condiciones asépticas se humectó el medio con 10 mL de agua estéril y se traspasaron las esporas al medio acuoso con la ayuda de un asa estéril. La solución de esporas fue almacenada en tubos Falcon estériles hasta su uso en la inoculación de los medios sólidos.

2.4 Optimización de los parámetros para fermentación en estado sólido de *Aspergillus niger*

Para obtener las condiciones óptimas de fermentación en estado sólido del hongo en estudio, se utilizó un diseño experimental 2³. Los valores mínimos y máximos de los niveles fueron obtenidos de trabajos previos (Kunamneni y col., 2005; Ellaiah y col., 2002; Puri y col., 2013; Parbat y Singhal 2011), Las variables y los niveles aplicados en el diseño experimental se presentan en el Cuadro 8.

Variables		Niveles	
		Valor mínimo (-)	Valor máximo (+)
Fuente de carbono (Glucosa)	X ₁	0,1 g	0,5 g
Fuente de nitrógeno (Levadura)	X ₂	0,1 g	0,5 g
Tiempo de fermentación	X ₃	168 h	240 h

Cuadro 8. Límites de los factores que se variaran en el proyecto de investigación.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Matriz de Diseño Experimental 2 ³			
Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Cuadro 9. Matriz de diseño experimental 2³.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Se realizaron ocho experimentos, aplicando los niveles presentados en el cuadro 9, La variable respuesta es la actividad enzimática de glucoamilasa, expresada como porcentaje de glucosa luego de la hidrólisis de una solución estándar de almidón. Los valores de la variable respuesta fueron obtenidos por espectrofotometría FTIR. Cada experimento fue realizado por triplicado.

2.5 Preparación de sustratos para la fermentación en estado sólido de *A. niger*.

Los medios sólidos para desarrollar la fermentación del hongo filamentoso *A. niger* se prepararon según la composición que se presenta en el siguiente cuadro:

	Componente	Cantidad / concentración
Sustrato sólido	Arroz	20 g
Sales minerales	CaCl ₂ , MgSO ₄ , K ₂ H(PO ₄), NaCl	3,5 g/L 4 g/L 0,5 g/L y 0,5 g/L; respectivamente
Fuente de Carbono	Glucosa	De 0,1 a 0,5 g
Fuente de Nitrógeno	Levadura	De 0.1 a 0,5 g

Cuadro 10. Componentes del sustrato para la fermentación de estado sólido.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Los medios de cultivo fueron dosificados en erlenmeyers de 500 mL y autoclavados a 121°C y 1.1 bar por 15 minutos. Cuando alcanzaron temperatura ambiente, los erlenmeyers con los medios sólidos fueron inoculados con 2 mL de solución de esporas.

Se aplicaron las condiciones de tiempo para el crecimiento del hongo en el sistema de fermentación en estado sólido preparado según las condiciones del diseño experimental.

2.6 Extracción del concentrado enzimático

De acuerdo al diseño experimental se realizó la extracción del concentrado enzimático producido por los cuatro primeros erlenmeyers, los cuales tuvieron un tiempo de fermentación de 168 horas. Trascurrido las 240 horas de fermentación en estado sólido se realizó la extracción del concentrado enzimático de los cuatro erlenmeyers faltantes.

Se trabajó en condiciones asépticas, dentro de la cámara de flujo laminar se realizó el filtrado de los medios de cultivo, previamente colocando 100 mL de agua destilada y homogenizándolos por 60 min a 80 rpm. El filtrado se colocó en tubos falcón de 50 mL centrifugándolos por 15 min a 4000 rpm. Después de 24 horas de reposo se tomó el sobrenadante para colocarlos en eppendorf de 1,5 mL.

El concentrado fue traspasado a eppendorfs y centrifugado por 20 min a 13500 rpm, para obtener un pellet. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet mediante la adición de 750 uL de solución tampón citrato 0,1 ml/L (pH 5). Los concentrados fueron colocados en el congelador hasta realizar la cuantificación de la actividad enzimática (Negi y Banerjee, 2009).

2.7 Cuantificación de actividad enzimática

La capacidad hidrolítica del concentrado enzimático se realizó por espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), que utiliza un dispositivo de reflectancia total atenuada (ATR) de ZnSe acoplado al FTIR, obteniendo espectros IR en modo absorbancia. El manejo, visualización y adquisición de espectros se realizó mediante el software OMNIC® (Thermo Fisher Scientific, 2015).

El método consistió en agregar 250 uL de extracto enzimático a 500 uL de almidón 1% (p/v) en eppendorfs, a baño maría por 60 min a 60 °C (Selvakumar y col., 1997; Pandey y Radhakrishnan, 1992). A continuación se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro infrarrojo, limpiando la celda con metanol para evitar interferencias. Con los datos obtenidos se determinó en porcentaje de glucosa, interpolando con una curva de calibración.

2.8 Clarificación enzimática en jugo de manzana

Para evaluar el potencial del concentrado hidrolítico como clarificante se probó su aplicabilidad en el tratamiento de jugo de manzana preparado artesanalmente. Para el efecto se seleccionaron los dos concentrados que presentaron mayor capacidad hidrolizante en el ensayo descrito en 2.7.

El jugo se preparó a partir de manzanas lavadas, peladas y escaldadas previo su licuado. Posteriormente se separó la pulpa del jugo usando un tamiz # 10 (Sandri y *col.*, 2013).

El ensayo, realizado por triplicado se describe a continuación: 10 mL de jugo de manzana se mezclaron con 5 uL de concentrado enzimático. La mezcla fue mantenida a 45 °C durante 60 minutos. Posteriormente las muestras se enfriaron en un baño de hielo para detener la reacción, el jugo se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. El porcentaje de transmitancia del sobrenadante fue determinado en un espectrofotómetro UV-VIS Ciba-Corning, ($\lambda = 650 \text{ nm}$) (Lee y *col.*, 2006; (Singh y Gupta, 2004).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

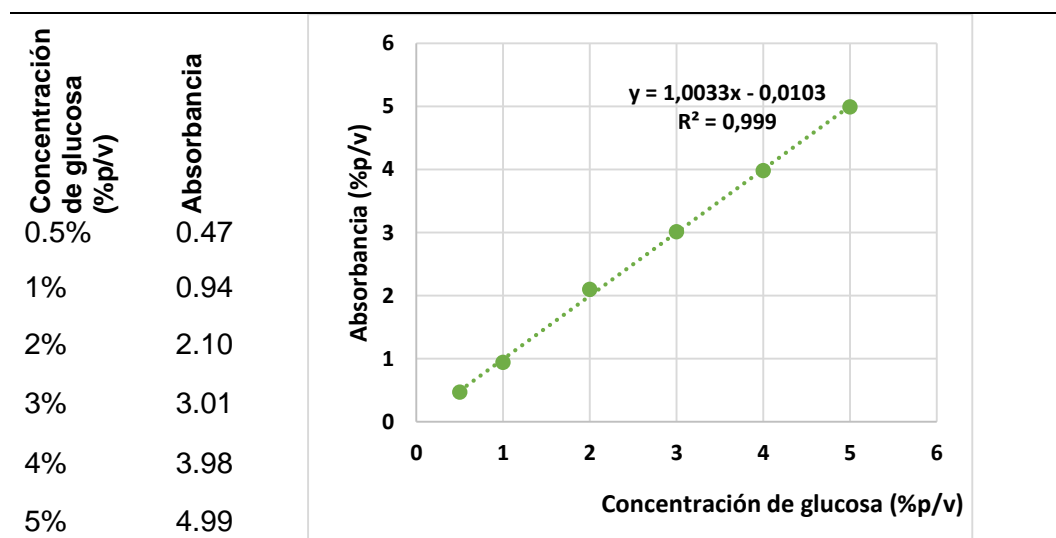
En este capítulo se analizarán los resultados obtenidos de la optimización de condiciones de fermentación en estado sólido y la actividad de los concentrados enzimáticos en la clarificación de jugo de manzana.

3.1 Optimización de parámetros de fermentación en estado sólido de *Aspergillus niger*

Para la optimización de la fermentación en estado sólido (FES) se analizó la influencia de tres parámetros: fuente de carbono (glucosa), fuente de nitrógeno (levadura) y tiempo de fermentación, en la producción de la enzima glucoamilasa.

Se realizó el diseño experimental 2³. Cada condición experimental fue hecha por triplicado. La variable respuesta expresa la capacidad hidrolítica de la enzima obtenida ante un sustrato de almidón.

Para estimar la concentración de glucosa se utilizó un modelo lineal obtenido a partir de soluciones estándar de glucosa. Los espectros IR de estas soluciones, obtenidos en modo absorbancia, permitieron aplicar la Ley de Beer. El procesamiento de los datos obtenidos del análisis, realizado por triplicado, fue realizado con la ayuda del software TQAnalyst®. Los datos y el gráfico se presentan a continuación:



Cuadro 11. Datos de concentración y absorbancia para curva de glucosa.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

En el Cuadro 12 se muestran los resultados de la concentración de glucosa obtenida mediante la hidrólisis de almidón, para cada concentrado enzimático obtenido según las condiciones experimentales descritas.

Experimento	Factores			Concentración de Glucosa* (% p/V)	Desviación estándar	Varianza
	Fuente de C (g)	Fuente de N (g)	Tiempo (horas)			
1	0,1	0,1	168	1,603	0,035	0,018
2	0,5	0,1	168	1,447	0,002	0,001
3	0,1	0,5	168	1,597	0,006	0,003
4	0,5	0,5	168	1,210	0,001	0,001
5	0,1	0,1	240	1,220	0,000	0,000
6	0,5	0,1	240	1,453	0,465	0,233
7	0,1	0,5	240	1,113	0,078	0,039
8	0,5	0,5	240	1,020	0,007	0,004

Cuadro 12. Diseño experimental para FES y actividad enzimática expresada como porcentaje de glucosa. (*Promedio de tres repeticiones)

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Las condiciones experimentales aplicadas para la optimización de parámetros de fermentación en estado sólido, permitieron obtener valores máximos de actividad hidrolítica, expresada como porcentaje de glucosa, de 1,6 y 1.59 %. Estas respuestas se generan al menor tiempo de fermentación (168 horas), y con la menor proporción de glucosa, que aporta Carbono al medio (0.1 g). El factor que diferencia a las dos condiciones experimentales donde ocurren los máximos de producción de enzimas es la fuente de Nitrógeno. Dado que las respuestas experimentales para las condiciones máximas son comparables, para escalar este proceso a nivel industrial sería adecuado adoptar el nivel menor de fuente de Nitrógeno, generado por la adición de 0.1 g de levadura al medio.

Resultados similares a nuestro estudio se reportan en literatura (Anto y col., 2005), obtuvieron una actividad enzimática (264 ± 0.64 U / gds) al formular un medio de cultivo para el crecimiento de *Aspergillus sp* con 0.16 de sacarosa como fuente de carbono. Las fuentes de nitrógeno empleadas en la formulación de medios para FES son variadas (Ribero y col., 2010), formularon un medio de cultivo para el crecimiento de *Aspergillus oryzae*, con adición de úrea como fuente de nitrógeno.

Para interpretar la influencia de los factores y sus interacciones en la variable respuesta, se calcularon los coeficientes de una ecuación polinomial. En cuadro 13 se presentan

los coeficientes para los factores; fuente de carbono (concentración de glucosa), fuente de nitrógeno (concentración de levadura) y tiempo de fermentación; sus interacciones secundarias y terciarias.

Coeficiente		Valor
β_0	Promedio	1,333
β_1	X_1	-0,050
β_2	X_2	-0,098
β_3	X_3	-0,131
β_{12}	X_1X_2	-0,07
β_{13}	X_1X_3	-0,037
β_{23}	X_2X_3	0,085
β_{123}	$X_1X_2X_3$	-0,012

Cuadro 13. Resultados de los parámetros de fermentación. Concentración de glucosa (X_1), concentración de levadura (X_2) y tiempo de fermentación (x_3).

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Ecuación Polinomial:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times x_1 + \beta_2 \times x_2 + \beta_3 \times x_3 + \beta_{12} \times x_1 \times x_2 + \beta_{13} \times x_1 \times x_3 + \beta_{23} \times x_2 \times x_3 + \beta_{123} \times x_1 \times x_2 \times x_3$$

$$Y = 1,33\beta_0 - 0,05\beta_1 \times x_1 - 0,098\beta_2 \times x_2 - 0,131\beta_3 \times x_3 - 0,069\beta_{12} \times x_1 \times x_2 - 0,037\beta_{13} \times x_1 \times x_3 + 0,085\beta_{23} \times x_2 \times x_3 - 0,012\beta_{123} \times x_1 \times x_2 \times x_3$$

La interpretación de los coeficientes de la ecuación polinomial permite establecer la influencia de las variables sobre la respuesta experimental. Los tres factores en estudio: aporte de carbono, nitrógeno y tiempo de fermentación presentan una influencia antagónica sobre la variable respuesta. No obstante, el aporte de nitrógeno tiene la menor influencia antagónica sobre la producción de enzimas hidrolíticas. De entre las interacciones binarias, la combinación del aporte de nitrógeno y tiempo de fermentación influencia positivamente la producción de enzimas hidrolíticas en condiciones de FES para *Aspergillus niger*.

La selección de un sustrato para la producción de enzimas en FES depende de varios factores, los cuales afectan el metabolismo microbiano. De entre los factores estudiados, el tiempo de fermentación en condiciones uniformes de temperatura influencia la actividad acuosa del medio (Pandey y col., 2000). Para mejorar los

resultados experimentales de actividad enzimática es adecuado considerar incrementar la proporción de carbono y nitrógeno y controlar la actividad acuosa del medio. Con nuevas condiciones experimentales es probable que se alcancen actividades enzimáticas más elevadas, las cuales influenciarán los valores de los coeficientes de un nuevo modelo polinomial.

3.2 Clarificación enzimática de jugo de manzana

Para evaluar el potencial de los concentrados enzimáticos que presentaron las actividades hidrolíticas más promisorias en las condiciones del diseño experimental aplicado. Se comparó el porcentaje de transmitancia de un jugo de manzana sin tratamiento versus el jugo sometido a un proceso de hidrólisis, descrito previamente en 2.8. Los resultados se presentan en el cuadro 14.

Condiciones Experimentales	Porcentaje de Transmitancia	Promedio	Desviación estándar
Glucosa: 0,1 g	44,05	31,20	11.95
Levadura: 0,1 g	28,9		
Tiempo de Fermentación: 168 horas	20,65		
Glucosa: 0,1 g	16,06	23,98	12.70
Levadura: 0,5 g	17,25		
Tiempo de Fermentación: 168 horas	38,63		

Cuadro 14. Valores de transmitancia a una longitud de onda de 650 nm.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Se realizó la clarificación enzimática comparando los concentrados enzimáticos con las condiciones iniciales uno y tres. El tratamiento enzimático se realizó a 45 °C por 60 minutos (Lee y col., 2006). Aunque en (Singh y Gupta, 2004), realizan variaciones de temperatura y tiempo de clarificación en jugo de manzana con enzimas comerciales.

El análisis de los resultados obtenidos demuestra que el concentrado enzimático obtenido en el medio formulado con la adición de 0.1 g de glucosa; 0,1 g de levadura y sometido a fermentación por 168 horas tiene un poder de clarificación de 31,20 %.

El jugo de manzana sin tratamiento presentó una transmitancia de 0.32% (promedio de tres repeticiones). Esto indica que los concentrados enzimáticos obtenidos por FES tienen potencial para clarificar jugos. Industrialmente, este proceso se desarrolla en un reactor mediante enzimas comerciales, o carbón activado. Por lo que, la generación de



alternativas biotecnológicas para generar estos suministros es de interés para la industria de alimentos local.

Las enzimas glucoamilasas son ampliamente utilizados en la fabricación de jarabes de glucosa y fructosa, en la degradación de almidón, por lo que son útiles en industrias de alimentos procesados, textil, papel, producción de dextrosa, confitería y productos farmacéuticos (Anto y col, 2005; Ellaiah y col, 2002).

4 CONCLUSIONES

La fermentación en estado sólido es uno de los procesos con mayor potencial para la producción de enzimas, debido a que es más cercano al hábitat natural de los microorganismos, por esta razón estos aumentan su actividad en este medio.

Mediante un diseño experimental factorial 2^3 se determinaron las condiciones óptimas de fuente de carbono (glucosa), fuente de nitrógeno (levadura) y tiempo de fermentación para obtener una mayor actividad enzimática de la enzima glucoamilasa, a partir del metabolismo de *Aspergillus niger*. La variable que se asocia al cambio más significativo en el proceso de fermentación es la fuente carbono (glucosa). El tiempo de fermentación no influencia significativamente en la producción de enzimas por el microorganismo de prueba.

La variable respuesta evaluada como capacidad de hidrólisis de almidón por los concentrados enzimáticos fue cuantificada por Espectrofotometría Infrarroja por Transformadas de Fourier. Se determinó que la mayor actividad hidrolítica, expresada como porcentaje de glucosa se encontró en el concentrado enzimático producido con 0,1 g de glucosa, 0,1 g de levadura y un tiempo de fermentación de 168 horas.

Al evaluar el potencial clarificante del concentrado enzimático en jugo de manzana, se obtuvo un porcentaje de clarificación de 31.22 %, expresado como transmitancia. Este resultado es significativo si se compara con el porcentaje de transmitancia del jugo de manzana sin tratamiento (0,32%).

El desarrollo del presente trabajo demuestra que la fermentación en estado sólido es una estrategia viable para la producción de concentrados enzimáticos útiles, con proyección a nivel industrial, se requiere de estudios en los cuales se evalúen nuevos factores experimentales y se varíen los límites de los factores para conseguir mejores respuestas experimentales.

5 RECOMENDACIONES

Es recomendable que al realizar la siembra o repiques de hongos filamentosos, *Aspergillus niger*, se realice en cultivo sólido PDA, ya que en este medio la esporulación del hongo es más rápida que en el cultivo sólido SDA.

Durante la preparación de sustratos para la fermentación en estado sólido es necesario trabajar en condiciones totalmente asépticas, para que no haya contaminación con otro tipo de microorganismo.

Se requiere desarrollar estudios similares que exploren otros factores que influyan en la producción de enzimas a partir del metabolismo microbiano. La purificación y estabilización de enzimas permitirá probar aplicaciones en procesos industriales y generar bioproductos a partir de fermentaciones microbianas.

Se recomienda que al realizar la clarificación de jugos de fruta, utilizando la enzima glucoamilasa se mida los °Brix antes y después de utilizarla, ya que esta enzima contiene pequeñas cantidades de oligosacáridos.

6 BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

Alegría, M. E. R. & Rosales, E. C. (2014). Enzimas: Aceleradores de reacciones químicas en las células y en la industria. Vol 15, No, (12).

Anto H. Trivedi U. B. Patel K. C. (2005). Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. *Bioresource Technology*, No. (97), 1161-1166.

Arellano-Carbajal, F., & Olmos-Soto, J. (1999). Enzimas amilolíticas microbianas. *Biotechnol*, 4, 115.

Baumann, J. W. (1981). Application of enzymes in fruit juice technology. *Enzymes and food processing*, 129-147.

Correa YM, Durango DL, García CM. (2009). Transformación microbiana del arilpropanoide cinamaldehído con el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*. *Vitae*. 16 (1): 83–91.

Criollo Calle, T. A., & Cueva Cabrera, M. E. (2017). Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de pulpa y jugo de uvilla (*Physalis Peruviana*), tomate de árbol (*Solanum Betaceum*) y manzana (*Pyrus Malus*) por espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) (Bachelor's thesis).

Gallego P. A., Garcinuño M. R., Morcillo O. M. J. (2013). Experimentación en Química Analítica. Madrid: Edición Digital.

García G. M., Quintero R. R., López-Munguía A. (2004). Biotecnología Alimentaria. Quinta Reimpresión. México: Editorial, Limsa, S. A.

Glynn H. J., Gary H. (1999). Ingeniería Ambiental. Segunda Edición. México: Editorial Hispanoamericana, S. A.

Hernández A., Alfaro I., Arrieta R. (2003). Microbiología Industrial. Primera edición. Editorial EUNED.

Herrera, D. S. (2015). Enzimas: Aplicaciones en la Industria Alimentaria. Obtenido de http://www.academia.edu/19423636/Enzimas_Aplicaciones_en_la_industria_de_alimentos.

Jaramillo Sánchez J. A. (2004). Pruebas de acceso para la Universidad para mayores de 25 años. Segunda edición. Sevilla: Editorial, MAD, S. L.

Kumar, S. (2015). Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. *health*, 6(6), 114-124.

Lagarda G. G. (2006). Microbiología industrial. *Reviste Latinoamericana Microbiología*. Vol 48. No (2), 91-98

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 42(1), 3-40.

Medina P. D., Lopez Reyes A. M. (2011). Análisis crítico del diseño factorial 2^k sobre casos aplicados. *Scientia et Technica Año XVIII*, No (47), 101-106.

Morales Bran. (2012). Microorganismos en la industria. Obtenido de: <http://biotecindustrial.blogspot.com/>.

Ochoa Gómez J, R. (2007). Industria Química basada en biomasa aplicaciones tecnológicas. *Informe. Fundación LEIA CDT. Observatorio Químico del MICYT*.

Pandey A. (2002). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, No. (13), 81-84.

Pandey A., Soccol C., Mitchell D. (2000). New developments in solid state fermentation: I bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, No. (35), 1153-1169.

Pastrana, L. (1996). Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *CYTA-Journal of Food*, 1(3), 4-12.

Piqué, T. M., & Vázquez, A. (2012). Uso de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. Concreto y cemento. *Investigación y desarrollo*, 3(2), 62-71.

Quilantán, P., & Manuel, L. (1996). Fermentación en estado sólido del mijo perla (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) por *Rhizopus oligosporus* para la obtención de un producto rico en proteína (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Ribeiro, D. S., Henrique, S., Oliveira, L. S., Macedo, G. A., & Fleuri, L. F. (2010). Enzymes in juice processing: a review. *International journal of food science & technology*, 45(4), 635-641.

Rodicio Cortes J. (2006). Espectroscopia de transformada de Fourier (Trabajo Académico, Departamento de Física Aplicada).

Rodríguez C., F. (2005). Biotecnología Ambiental: Tecnología Enzimática. España: Primera edición, Editorial Tébar, S: I.

Sánchez, C. P., Mejía, C. E., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L. M., Zapata, N., & Gómez, M. (2005). Estudio de cepas nativas amilolíticas. *Vitae*, 12(2).

Sandri, I. G., Fontana, R. C., Barfknecht, D. M., & da Silveira, M. M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT-food Science and Technology*, 44(10), 2217-2222.

Sandri, I. G., Lorenzoni, C. M. T., Fontana, R. C., & da Silveira, M. M. (2013). Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT-Food Science and Technology*, 51(2), 469-475.

Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., & Svensson, B. (2000). Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 275-293.

Singh, S., & Gupta, R. (2004). Apple juice clarification using fungal pectinolytic enzyme and gelatin. Vol (3), 573-576.

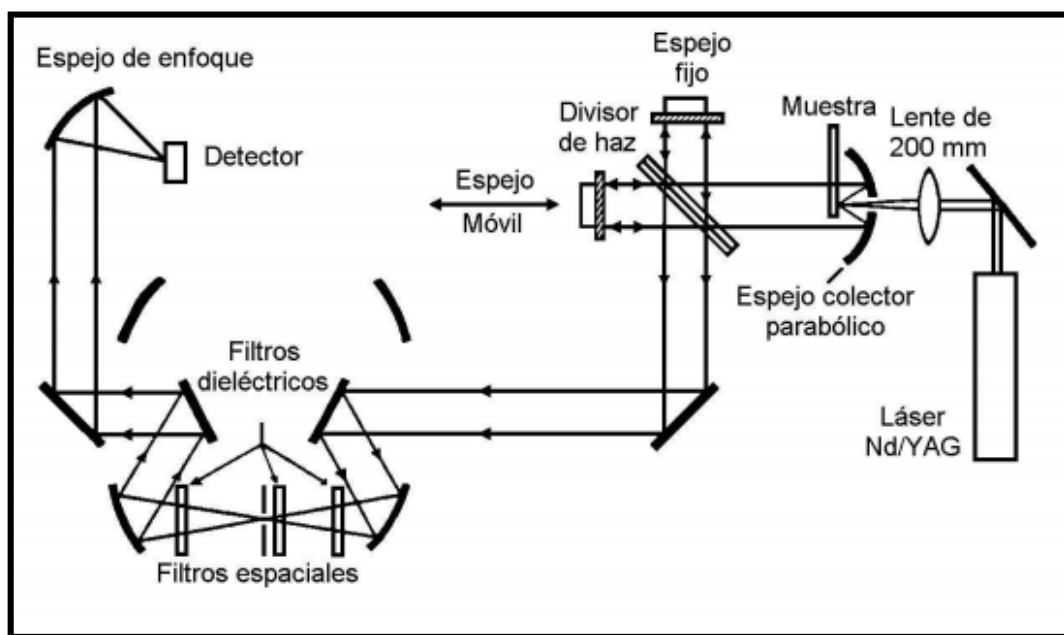
Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18.

Tortora G., Funke B., Case C. (2007). Introducción a la Microbiología. Novena Edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S. A.

Ubalde M., Villadóniga C., Cecilia G., Giacomini C., Grazú V. (2002). Generalidades de Enzimas. Obtenido de <https://clasesparticularesdebioquimica.files.wordpress.com/2015/07/repartido-enzimas.pdf>.

7 ANEXOS

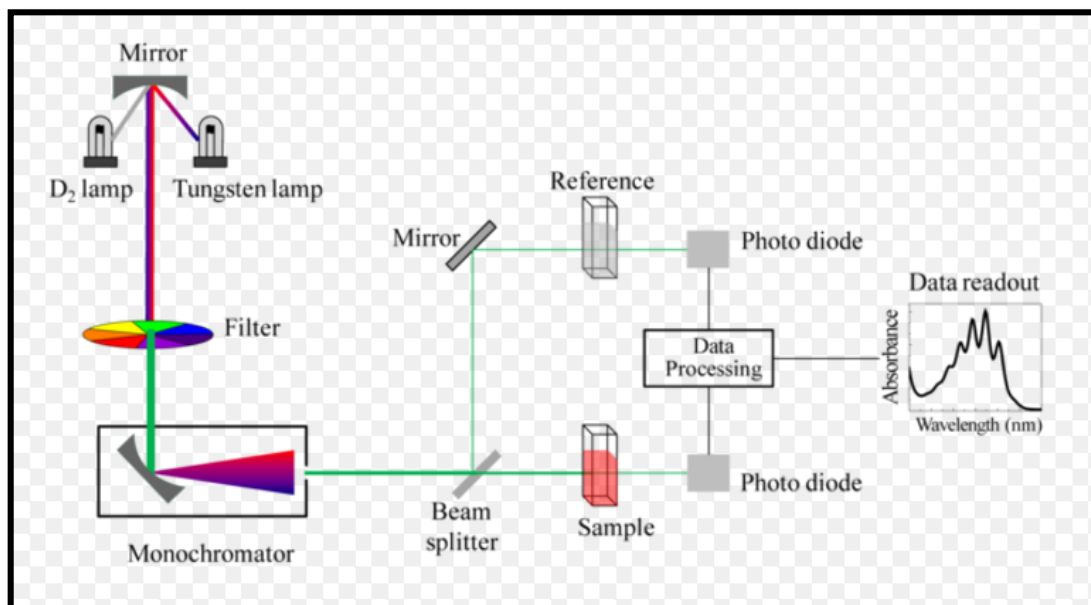
Anexo 1. Ilustración de los componentes de un espectrofotómetro infrarrojo por transformadas de Fourier.



Fuente: Rodicio, 2006

Elaboración: Fuente

Anexo 2. Ilustración de los componentes básicos de un espectrofotómetro UV-VIS.



Fuente: (Gallego y col., 2013).

Elaboración: Fuente

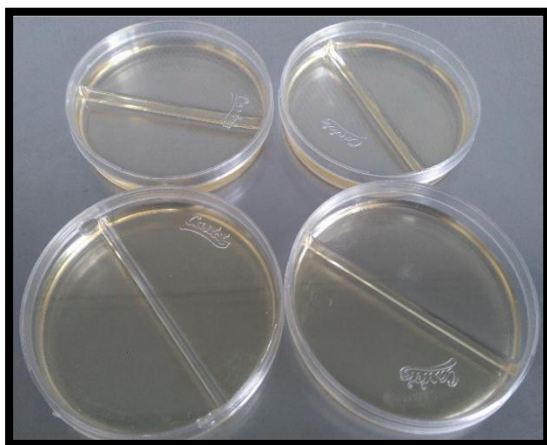
Anexo 3. Tabla de los valores obtenidos en las condiciones experimentales por triplicado.

Condiciones Experimentales	Factores			Porcentaje de glucosa	Porcentaje de glucosa*	desviación estándar	varianza
	Fuente de C (g)	Fuente de N (g)	Tiempo (horas)				
1	0,1	0,1	168	1,67			
1.	0,1	0,1	168	1,45	1,603	0,035	0,018
1..	0,1	0,1	168	1,69			
2	0,5	0,1	168	1,45			
2.	0,5	0,1	168	1,41	1,447	0,002	0,001
2..	0,5	0,1	168	1,48			
3	0,1	0,5	168	1,6			
3.	0,1	0,5	168	1,54	1,597	0,006	0,003
3..	0,1	0,5	168	1,65			
4	0,5	0,5	168	1,24			
4.	0,5	0,5	168	1,19	1,210	0,001	0,001
4..	0,5	0,5	168	1,2			
5	0,1	0,1	240	1,23			
5.	0,1	0,1	240	1,22	1,220	0,000	0,000
5..	0,1	0,1	240	1,21			
6	0,5	0,1	240	1,16			
6.	0,5	0,1	240	1,19	1,453	0,465	0,233
6..	0,5	0,1	240	2,01			
7	0,1	0,5	240	1,15	1,113	0,078	0,039

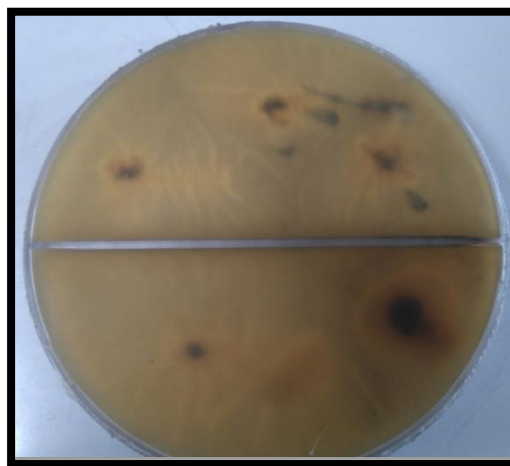
7.	0,1	0,5	240	0,9			
7..	0,1	0,5	240	1,29			
8	0,5	0,5	240	1,09			
8.	0,5	0,5	240	0,99	1,020	0,007	0,004
8..	0,5	0,5	240	0,98			

Anexo 4. Fotografías de Trabajo de Investigación.

Cajas petri con PDA y SDA.

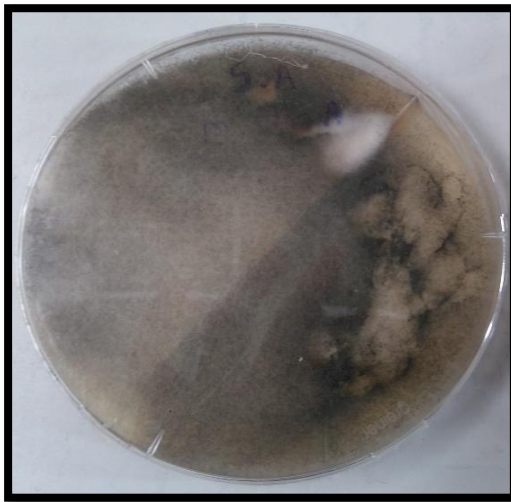


Parte de atrás de caja petri con cepa de hongos *Aspergillus niger*.



Parte de delante de cajas petri con cepa de hongos *Aspergillus niger*.

Morfología de hongos *Aspergillus niger* de cepa aislada.



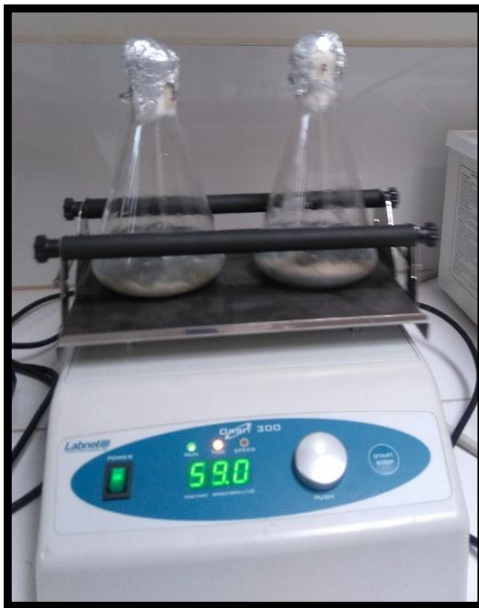
Solución de esporas de *Aspergillus niger*. Inyección de solución de esporas en medios de cultivo.



Fermentación en estado sólido para producción de enzima glucoamilasa



Homogenizado de Erlenmeyer



Filtrado de solución enzimática



Solución enzimática

Pelels de enzima glucoamilasa



Concentrado enzimático

Jugo de manzana clarificado

